

007178277

WPI Acc No: 1987-175286/198725

XRAM Acc No: C87-073359

XRPX Acc No: N87-131294

Antibody used as diagnostic drug for cancer - is prepd. using specified peptide chain as antigen

Patent Assignee: AJINOMOTO KK (AJIN )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 62108157	A	19870519	JP 85248639	A	19851106	198725 B
JP 95006982	B2	19950130	JP 85248639	A	19851106	199509

Priority Applications (No Type Date): JP 85248639 A 19851106

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 62108157	A		4		
JP 95006982	B2		4	G01N-033/53	Based on patent JP 62108157

Abstract (Basic): JP 62108157 A

Antibody is obtained by using a peptide of formula (I) as the antigen

Thr-Ala-Glu-Asn-Pro-Glu-Tyr -Leu-Gly-Leu-Asp-Val-Pro-Val (I)

USE/ADVANTAGE - The antibody produced an antibody to the product of the C-erbB-2 gene concerning Carcinogenesis and the antibody is used as a diagnostic drug for cancer. C-erbB-2 gene is a cellular gene having a structure similar to the V-erbB carcinogenetic gene of the erythroblast virus and a epithelial propagation factor receptor. The gene is thought to code the receptor of the propagation factor. The gene occurs during amplification or rearrangement at the adenocarcinoma of the human hypocondular gland.

In an example, the antigen protein was prepd. by selecting a peptide of formula (I) from C-erbB-2 gene structure. Synthesis of the peptide was carried out by solid phase process by means of Beckmann Co.-made 990B automatic peptide synthesis apparatus. The synthesised peptide was heated in 75% hydrogen fluoride/25% anisole at 0 deg.C for 30 mins. and the resultant peptide was eliminated from the resin.

Title Terms: ANTIBODY; DIAGNOSE; DRUG; CANCER; PREPARATION; SPECIFIED; PEPTIDE; CHAIN; ANTIGEN

Derwent Class: A96; B04; D16; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/53

International Patent Class (Additional): A61K-039/39; A61K-039/395;

C07K-007/08; C07K-015/00; C07K-099/00; C07K-099-00; C12N-005/10;

C12N-015/02; C12P-021/02; G01N-033/574

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): A12-L04; A12-W11L; B04-B04C6; B12-K04A1; D05-H11

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H4

Plasdoc Codes (KS): 0231 2706 3272 2768

Polymer Fragment Codes (PF):

\*001\* 014 04- 53& 623 624 643 645 726

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M720 M781 M903 N135 N460 P831 Q233 V600 V611

English Translation of the claim of JP 62-108157: .

62-108157

Application No.: 60-248639

Filing Date: November 6, 1985

Laid Open Date: May 19, 1987 (JP A 62-108157)

Pulication Date: January 30, 1995

Date of Official Decision to Grant a Patent:

August 1, 1997

Applicant: Nichirei

Title: Antibody

1. An antibody obtained by using a peptide bound to a carrier protein as an immunogen, wherein said peptide is:

Thr-Ala-Glu-Asn-Pro-Glu-Tyr-Leu-Gly-Leu-Asp-Val-Pro-Val.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許出願公告番号

特公平7-6982

(24) (44)公告日 平成7年(1995)1月30日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53	D	8310-2J		
A 6 1 K 39/395	E	9284-4C		
C 1 2 N 5/10		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9050-4B	15/ 00	C
発明の数1(全 4 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願昭60-248639	(71)出願人	999999999 株式会社ニチレイ 東京都中央区築地6丁目19番20号
(22)出願日	昭和60年(1985)11月6日	(72)発明者	秋山 徹 東京都多摩市関戸291-8 ザ・スクエア B-1308
(65)公開番号	特開昭62-108157	(72)発明者	江口 新比古 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社中央研究所内
(43)公開日	昭和62年(1987)5月19日	(74)代理人	弁理士 戸田 親男
		審査官	柏崎 康司
		(56)参考文献	Science (Washington, D. C.), 230 (4730), P. 1132-9, 1985

(54)【発明の名称】 抗 体

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記のペプチドにキャリアー蛋白質を結合してなるキャリアー蛋白結合ペプチドを免疫源として得られた抗体

Thr-Ala-Glu-Asn-Pro-Glu-Tyr-Leu-Gly-Leu-Asp-Val-Pro-Val

【発明の詳細な説明】

産業上の利用分野

この発明は抗体に関し、更に詳しくは、発癌に関与しているといわれているC-erbB-2遺伝子の産物に対する抗体に関する。このような抗体は、癌の診断薬として使用できる。

従来の技術

C-erbB-2遺伝子は赤芽球症ウイルスの発癌遺伝子V-erbB及び上皮増殖因子レセプターときわめて類似した構造を

2

もつ細胞性遺伝子で、増殖因子のレセプターをコードしていると考えられている。

この遺伝子は、ヒト顎下腺の腺癌、胃癌、乳癌等で遺伝子増幅や再配列をおこしており、これらの癌で多量に遺伝子産物を発現していることが明らかとなっている。

また、神経／膠芽腫から見出されneuと名づけられた発癌遺伝子はC-erbB-2であることが明らかとなっている。従って、このようなC-erbB-2遺伝子産物に対する抗体はヒトの癌の診断に使用できる。

10 発明が解決しようとする問題点

この発明の目的は従って、C-erbB-2遺伝子産物に対する抗体を得ることにある、C-erbB-2遺伝子産物に対する抗体は癌の診断薬として使用できる。

問題点を解決するための手段

このような状況下において、本発明者らは、C-erbB-2遺

伝子産物のカルボキシル末端の下記のアミノ酸配列

(以下「抗原ペプチド」と記す)を抗原としてC-erbB-2 遺伝子産物に対する抗体を得ることに成功した。

抗原ペプチド:

Thr-Ala-Glu-Asn-Pro-Glu-Tyr-Leu-Gly-Leu-Asp-Val-Pro-Val

抗原ペプチドを用いて抗血清を得るには、抗原ペプチドと適当なキャリアー蛋白と結合せしめて後、抗原として用いる。

キャリアー蛋白としては、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン等、従来知られているもののいずれも使用できる。キャリアー蛋白と抗原ペプチドとを結合せしめるにはサイジニミドを用いる方法 (T. Kitagawa et al, J. Biochem. 79, 233 (1976)) を用いればよい。

キャリアー蛋白と抗原ペプチドとの結合物を用いて、マウス、ウサギ、ラット、ヒツジ等の動物を免疫する。免疫方法も又通常の方法でよい。

得られた抗血清より本発明の抗体を得る方法も従来知られているいずれの方法も採用できる。具体的には、例えば、採血後、抗血清を作成する、C-erbB-2遺伝子が多量に発現しているヒト胃癌細胞MKN7を<sup>35</sup>S-Metでラベルした後、細胞を可溶化し、採取した抗血清で免疫沈降を行なう。沈降した物質をSDS-電気泳動で解析し、分子量185,000のC-erbB-2蛋白が検出できるか否かで、C-erbB-2 遺伝子産物に対する抗体があるか否かが判定できる。

あるいは上記のように免疫した動物のリンパ球とミエローマとを融合させ、本発明の抗体を特異的に産生するハイブリドーマを得、これによってモノクローナル抗体として、本発明の抗体を得ることもできる。

このようにして得られた免疫グロブリンは、以下のような性質を有するものである。

- 1) 免疫グロブリンの種類 : IgG
- 2) 分子量 : 150×10<sup>3</sup> dalton
- 3) 分子吸光係数 :

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} 280\text{ nm} = 1.40$$

- 4) 得られた抗体は、C-erbB-2遺伝子産物と反応する。作用

本発明の抗体は癌の診断薬として使用できるほか、癌の治療薬として使用できる可能性がある。

実施例

#### (1) 抗原蛋白の調製

抗原性が高いペプチドは、C-erbB-2遺伝子構造から、Thr-Ala-Glu-Asn-Pro-Glu-Tyr-Leu-Gly-Leu-Asp-Val-Pro-Valとした。本ペプチドの合成はベックマン社990B自動ペプチド合成装置を用い固相法で行なった。

合成されたペプチドを、75%フッ化水素/25%アニソール中で30分間0℃で加温することにより樹脂から脱離し

た。合成されたペプチドは、SP-セファデックスカラム (2.5cm×50cm) (0.05M酢酸アンモニウム、pH7.0及び1mMジチオスライトールで平衡化) に吸着させた。500mlの同緩衝液と、0.5M酢酸アンモニウム及び1mMジチオスライトールpH7.0、500mlのグラジエントで目的のペプチドを分画精製した。各画分をフルオロレスカミンでペプチドを検出し、ペプチド含有画分を集め、濃縮した。30%酢酸で平衡化したセファデックスG-10カラム (10cm×50cm) に上記濃縮液を加え蛋白画分を集めた。得られたペプチド画分を濃縮乾固した。ペプチドの構成アミノ酸組成は、ペプチドを1N塩酸で120℃1晩の加水分解により調べた。加水分解物はアミノ酸アナライザーを用いて測定した。

ペプチドのアミノ酸組成は以下の通りであった。

Asn0.9; Asp1.0; Ala1.0; Gly0.9;  
Glu2.0; Leu1.9; Thr1.0; Tyr0.9;  
Prol.9; Val2.0

このペプチドにキャリアー蛋白を以下のように付加させた。10mg/ml (10mMリン酸バッファーpH7.0) にとかしたキーホールリンペットヘモシアニンと63μlの15mg/mlm-マレイミド-N-ハイドロキシサクシミドエステルとを混合し、30分間室温に保持反応した。反応液を4℃で、0.1Mリン酸バッファー (pH6.0) で平衡化した「セファデックスG-25」を用いて、カラムクロマトグラフィを行った。2.3mlの活性化したキーホールリンペットヘモシアニンと0.1mlの合成した当該ペプチド (10mg/mlにリン酸バッファーpH7.3+5mMEDTA) を混合し、pHを6.5にあわせ混合した。4時間室温で混合し、キーホールリンペットヘモシアニンと合成した当該ペプチドを結合させた。結合したか否かをSDS-電気泳動により確認した。

#### (2) 抗体の調製

得られたキャリアーとペプチド結合物1mgをフロインドの完全アジュバンドと共にウサギの指掌部に注射した。以後3週間間隔で200μgずつ4回ウサギ背皮下に免疫した。最終免疫の後10日目に採取し血清を得た。血清を遠心 (10000×g, 5分) した上清に飽和硫酸溶液 (pH7.4) を加えて40%飽和とした。一晩氷冷下で攪拌した後、10000×gにて5分間遠心し、沈殿物を得た。沈殿物を蒸留水に溶かし、200倍量の0.15MNaClに対し、36時間透析した。得られた抗血清2mlを10mMリン酸緩衝液 (pH7.2) で平衡化したDEAE-セルロース (ワットマンDE32) カラム (1cm×15cm) に添加した。免疫グロブリンIgG画分は素通りして溶出されるので、この画分を回収した。2mlの抗血清から24mgのIgGが得られた。集めたIgGを0.1M炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.0) に透析した。

次にキャリアー蛋白に用いたキーホールランペットヘモシアニンに対する抗体を除去するため、キャリアー蛋白-結合セファロース4Bカラムを用いてキャリアー蛋白抗体を結合させた。すなわち、CNBr-活性化セファロース

4B (ファルマシア製17-0431-01) 0.5gを0.1M炭酸緩衝液 (pH9.0) 5mlに投入し、ただちに、キーホールランペッ トヘモシアニン25mgを加え、氷冷しながら24時間攪拌した。このようにしてできたキャリアー蛋白結合セファロース4Bを0.5cm×20cmのカラムにつめ、このカラムにIgG画分2mlをのせた。洗浄用緩衝液 (0.15MNaCl/0.02M炭酸ナトリウム緩衝液, pH8.0) で洗浄し、未結合のまま溶出した蛋白をすべて集めた、得られたIgGはさらにペプチドを結合させたセファロース4Bカラムで精製した。ペプチド結合セファロース4Bカラムの作成方法は前述の通り、このペプチド結合セファロース4Bカラム (0.5cm×20cm) に上記で得られたIgG画分をのせ、洗浄用緩衝液 (0.15MNaCl/0.02M炭酸ナトリウム緩衝液, pH8.0) で十分洗浄し、0.17Mグリシン-塩酸緩衝液 (pH2.3) でカラムに吸着した抗ペプチド抗体を溶出させた。集めた溶出液を0.15MNaClに対して透析し、限外濾過で濃縮した。このようにして2.5mg/mlのIgG溶液0.5mlを得た。

### (3) C-erbB-2遺伝子産物抗体の性質

#### (3) - 1IgGであることの証明

精製したC-erbB-2蛋白抗体がIgGクラスであることは、抗体のクラス別に作成された抗Ig抗体で免疫沈降するかどうかで判定できる、すなわち抗ウサギIgG抗体 (カッペル社製No. 0212-0124)、抗ウサギIgM抗体 (カッペル社製No. 0212-0210)、抗ウサギIgA+IgM+IgG抗体 (カッペル社製No. 0212-0234) を用いて免疫沈降した。方法はオクタロニー法を用いた。すなわち、1%の寒天中にあけた穴の中心に抗ウサギIg抗体3種を入れ、まわりの穴には抗体に対して1/20量から2倍づつ希釈した精製C-erbB-2遺伝子産物抗体を入れる。0℃で1晩放置後形成された沈降線を観察した所、精製C-erbB-2蛋白抗体は抗ウサギIgG抗体及び抗ウサギIgA+IgM+IgG抗体とのみ沈降したことからIgGであると確認できた。

#### (3) - 2分子量

精製したC-erbB-2遺伝子産物抗体の分子量はセファデックスG-100を用いるゲル濾過法により求めた。すなわち0.02M炭酸ナトリウム緩衝液で平衡化させたセファデックスG-100 (1cm×100cm) カラムに1mgの精製C-erbB-2遺

伝子産物抗体をのせ、同緩衝液で展開した。

280nmの吸光度で溶出蛋白を検出し、分子量測定スタンダード (バイオラッド社製No. 151-1901, チログロブリン分子量670000, γ-グロブリン158000, 卵白アルブミン44000, ミオグロビン17000, ビタミンB-12 1350) の溶出パターンと比較した所分子量150000の所にC-erbB-2遺伝子産物抗体が溶出した。

#### (3) - 3分子吸光係数

1mgの精製C-erbB-2遺伝子産物抗体を炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.0) 1mlに溶解し、280nmの吸光度を測定した所、1.40を示したので、本蛋白の分子吸光係数

$$E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1.40$$

である。

#### (3) - 4抗体の免疫特異性

C-erbB-2遺伝子の発現しているヒト胃癌MKN7細胞を100 μCi/mlの<sup>35</sup>S-メチオニンでラベルする。ラベルされた細胞を洗浄した後、RIPA緩衝液 (1%NP-40, 0.1%デオキシコール酸-Na塩, 0.15MNaCl, 1mMフェニルエチルスルフォニルフルオライド, 50mMTris-HClpH7.4) に懸濁し、0℃にて20分溶解させた。溶出液を100,000×gにて30分間遠心後、上澄液を得た。この上澄液150 μlと前に得られた抗体10 μlを1時間0℃反応させた、抗原-抗体複合体はプロテインAセファロースCL-4B (ファルマシア製17-0780-01) であつめた。抗原-抗体複合体沈殿物をLaemmliの方法に従い10%SDS-gelにて電気泳動した。得られたゲルを常法に従ってラジオオートグラフィーにより分析した。

表1より明かなように、抗C-erbB-2遺伝子産物血清はヒト胃癌MKN7細胞から分子量185000の蛋白を沈降した。C-erbB-2遺伝子の発現していない正常細胞ではこの蛋白は沈降しない。また抗C-erbB-2遺伝子産物抗体を免疫に用いたペプチドで吸収してから同様の実験をおこなうと、この蛋白は沈降しないことがわかった。したがってC-erbB-2遺伝子産物抗体はC-erbB-2遺伝子産物を認識していることが明らかである。

表1. 抗C-erbB-2遺伝子産物抗体による免疫沈降物

		コントロール血清	抗C-erbB-2遺伝子産物抗体	抗C-erbB-2遺伝子産物抗体+ペプチド
正常細胞	CEF	4.5万蛋白	4.5万蛋白	4.5万蛋白
	// 3Y1	4.5万蛋白	4.5万蛋白	4.5万蛋白
C-erbB-2発現細胞	(ヒト胃癌細胞MKN7)	4.5万蛋白	4.5万蛋白+18.5万蛋白	4.5万蛋白

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 15/02

C 1 2 P 21/02

G 0 1 N 33/574

// C 0 7 K 7/08

C 0 7 K 99:00

A 9282-4B

Z 9015-2J

8318-4H